

2,5X Mas^{HTS}MIX -1525Для исследовательских работ *in vitro***МастерМИКС^{HTS} для ПЦР**

Кат.№	Количество
MUS-50	50 реакций
MUS-100	100 реакций

Качество МастерМикса гарантируется на протяжении не менее 1 года, при хранении всех реактивов при -20°C

Внимание!

Перед использованием необходимо выдержать МастерМикс при комнатной температуре до полного размораживания (~30 мин.), интенсивно перемешать и отцентрифугировать.

МастерМикс^{HTS}**1X:**

UltraSmarTaq полимеразы

dA,dT,dC,dG -200µM каждого

Компоненты реакционного буфера

MgCl₂ – 1,5mM

Стабилизатор/энхансер

Краски для электрофореза (**Xylene Cyanol+OrangeG**)

Стерильная вода для ПЦР -5мл (прозрачная крышка)

МастерМИКС^{HTS} содержит высококачественные реактивы для ПЦР амплификации ДНК различной природы.

Описание:

МастерМикс^{HTS} рекомендуется для проведения амплификации ДНК, выделенной из различных природных объектов.

МастерМикс^{HTS} смесь ПЦР реагентов, содержащая стабилизатор/энхансер, усиливающий термостабилизацию фермента при повышенных температурах, улучшающий специфичность и чувствительность ПЦР.

Основой **МастерМикс^{HTS}** является термостабильная химерная **UltraSmarTaq** полимеразы, обладающая высокой процессивностью, позволяющая амплифицировать низкокопийные ДНК матрицы, сложные последовательности ДНК, с содержанием GC-пар до 65%.

UltraSmarTaq полимеразы обладает повышенной термоустойчивостью, а также резистентности к различным ингибиторам ПЦР (в частности компонентов крови)., за счет модификации фермента.

UltraSmarTaq полимеразы позволяет проводить амплификацию с модифицированными трифосфатами (dUTP), что дает возможность использовать данный продукт в «анти-контаминационной» ПЦР в комбинации с пост-ПЦР обработкой UDG.

Высокая процессивность и термостабильность **UltraSmarTaq** полимеразы позволяют значительно уменьшить время амплификации, сократив его практически в 2 раза по сравнению со «стандартной» ПЦР (для проведения так называемой "fast-PCR" необходимо использование амплификаторов с большой скоростью нагрева/охлаждения образца при амплификации), с сохранением эффективности ПЦР и увеличением выхода ПЦР –продукта.

Наличие у **UltraSmarTaq** полимеразы 5'->3' экзонуклеазной активности позволяет использовать в ПЦР в «реальном времени» практически во всех методах «real-time» амплификации, включая Taq man - и другие модификации зондов.

Неоспоримым преимуществом **UltraSmarTaq** полимеразы , по сравнению с известными ферментами на основе Taq-полимеразы, является возможность амплификации ДНК непосредственно из образца крови, практически вне зависимости от типа стабилизатора – гепарин, цитрат или EDTA.

Фермент стабилен и эффективен при концентрациях крови в образце вплоть до 10-15%.

Реакционная смесь, содержащая **МастерМикс^{HTS}**, после проведения амплификации может быть нанесена непосредственно на гель, без проведения дополнительных манипуляций (добавления соответствующего буфера), что значительно сокращает время и экономит расходные материалы.

Протокол амплификации с 2,5X Mas^{HTS} MIX -1525

ПЦР амплификация с использованием **UltraSmarTaq** полимеразы очень похожа на условия использования **fusion** полимераз т.е. UltraSmarTaq полимеразы лучше работает при повышенных температурах денатурации и отжига праймеров.

Собирать ПЦР реакцию можно при комнатной температуре – активность **UltraSmarTaq** блокирована специфическими моноклональными антителами, что оставляет фермент не активным при температурах до 60°C. Активация фермента наступает в процессе начальной денатурации и не требует специальной стадии прогрева для активации, в противовес химически модифицированным Taq- полимеразам.

Приготовьте мастермикс для соответствующего количества образцов, исходя из приведенных ниже пропорций.

Смешайте следующие компоненты :

Компонент	50µL реакция	25µL реакция	Конечные 1X концентрации
Вода для ПЦР (без ДНКаз)	до 50 µL	до 25 µL	
2.5x МастерМикс ^{HTS}	20 µL	10 µL	1X
Праймеры			0.3-0.5 µM каждого
ДНК матрица	опционно	опционно	> 10 нг

- 2,5X МастерМикс^{HTS} содержит 1,5mM MgCl₂ (в конечной 1X концентрации). В некоторых случаях необходима оптимизация наиболее эффективной концентрации MgCl₂ в интервале 1,5-3,5mM.

Рекомендованный объем ПЦР реакции – 50 мкл.

Условия Амплификации

	2-х стадийный ПЦР		3-х стадийный ПЦР		Кол-во циклов
	Т°C	время	Т°C	время	
Начальная денатурация	98°C	0,5-2 мин	98°C	0,5-2 мин	1
Денатурация	98°C	5-10 сек	98°C	5-10 сек	25-35
Отжиг	-	-	55-72*	10-30 сек	
Элонгация	65-72°C***	15 сек/Kb	72°C	15-30 сек/Kb**	
Финальная элонгация	72°C	1-2 мин	72°C	1-2 мин	1
	4°C	hold	4°C	hold	

*- Оптимальная температура T_m, рекомендуется как наименьшая температура плавления одного из праймеров, для стандартных олигонуклеотидов <22 н.п.

Для **UltraSmarTaq** полимеразы рекомендуется скорректировать температуру отжига в пределах +3-10°C, по сравнению с ПЦР условиями амплификации с использованием Taq полимераз или ферментов на основе **Taq** (смеси **Taq+Pfu**, **Taq+KlenTaq**, **KlenTaq+Pfu** и т.д.)

** - Для сравнительно не сложных ДНК матриц (плазмидная ДНК, фаговая ДНК, ВАС клоны) время элонгации может быть уменьшено до 15 сек/Kb.

Для геномной ДНК (человеческой) рекомендуется элонгация не менее 30 сек на 1 Kb, при амплификации ДНК фрагментов превышающих 2Kb. Для фрагментов ДНК длиной менее 1,5Kb. элонгацию можно ограничить 15 сек/Kb.

НЕ РЕКОМЕНДУЕТСЯ превышать указанное время элонгирования во избежании образования неспецифических продуктов и уменьшения выхода целевого продукта.

***- Для проведения двух-стадийной ПЦР , рекомендуется подбирать праймеры T_m которых находится в пределах 62-70°C. В случае, если T_m пары праймеров лежит в области 62-65°C, рекомендуется пользоваться простым равенством для определения стартовой температуры отжига/элонгирования – (72°+ T_m праймера с минимальным значением)/2.

Если T_m праймеров (обоих) > 65°C , то рекомендованная совмещенная температура отжига/элонгирования будет находиться в интервале 70-72°C.

Для определения наиболее эффективной T отжига/элонгирования рекомендуется провести амплификацию в градиенте – это позволит сократить время оптимизации ПЦР.

При использовании цельной/стабилизированной крови в качестве матрицы для амплификации – не рекомендуется превышать концентрацию крови свыше 5% (в большинстве случаев достаточно 1-2мкл на реакцию в 50 мкл объеме), в виду образования значительного количества клеточного дебриса в процессе амплификации.

Не рекомендуется использовать кровь в качестве образца при проведении ПЦР в «реальном времени» в виду значительного поглощения компонентами крови флуоресцентного сигнала.